

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C} \text{ (} \text{---} \text{) } \text{C}_6\text{H}_2 \text{ (} \text{---} \text{) } \text{CH}_3 \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{CO} \text{C}_6\text{H}_2 \text{ (} \text{---} \text{) } \text{C} \text{---} \text{CH}_2\text{---} \text{CH} \text{---} \text{C} \text{---} \text{CH}_2\text{---} \text{CH}_3 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$$

⑬日本国特許庁(JP)

⑭特許出願公開

⑯公開特許公報(A)

昭54—122794

⑮Int. Cl.²
C 12 D 13/06

識別記号 ⑮日本分類
36(2) D 251

庁内整理番号 ⑯公開 昭和54年(1979)9月22日
6760—4B

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑰L-グルタミン酸の製造法

⑱発明者 高山健一郎

厚木市高尾1丁目9番10号

⑲特願 昭53—28821

⑲出願人 協和醸酵工業株式会社

⑲出願 昭53(1978)3月14日

東京都千代田区大手町一丁目6
番1号

⑲発明者 勝亦一

相模原市文京1—13—8

明 細 書

1. 発明の名称

L-グルタミン酸の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテ

リウム属に属する微生物を培地に培養してL-グルタミン酸を培地中に蓄積させ、これを採取する方法において、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する^{過剰の}ビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない菌株を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

(2) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する^{過剰の}ビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物。

(3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミナムまたはプレビバクテリウム・フラブムに

属する菌株から選ばれた特許請求の範囲2の微生物。

(4) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミナムK17703(農工研寄託受贈番号第44/3、NRRL/1271)、コリネバクテリウム・グルタミナムK17705(農工研寄託受贈番号第44/3、NRRL/1272)、およびプレビバクテリウム・フラブムK17733(農工研寄託受贈番号第44/4、NRRL/1273)から選ばれた特許請求の範囲3の微生物。

3. 発明の詳細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してL-グルタミン酸を培地中に蓄積させ、これを採取する方法において、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する^{過剰の}ビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない菌株を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造法に関する。

※字加入

以下本発明をさらに詳細に説明する。

本発明によればコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する^{通病の}ビオチンによつて^{3字加入}L-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物を培地に培養すれば培地中にL-グルタミン酸が蓄積するので、これを採取することにより高収率にL-グルタミン酸が得られる。

本発明に用いる微生物はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する^{通病の}ビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物であればいかなる菌株をも用いることができる。一般にはコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、L-グルタミン酸生産能を有する菌株を菌株とし、これを変異誘導処理して得られた変異株からリゾチームに感受性を有するものを選択し、これを用いる。変異誘導の方法としては、紫外

生育にビオチンを要求するL-グルタミン酸生産菌のL-グルタミン酸生産性は培地中のビオチン濃度と極めて密接な関係があり、生育に対して制限量のビオチン濃度のときはじめてL-グルタミン酸を生産できる。一方安価な培地の粗原料として利用される腐植酸澱粉加水分解物などはビオチンを多量に含有している。これら粗原料を含有する培地にL-グルタミン酸生産菌を培養する方法としては特公開37-1691号公報、特公開38-25288号公報などに記載されている方法が知られているが、工業的にはさらに優れた方法が望まれている。

本発明者らは、安価な粗原料を用い、過剰量のビオチンの作用を回避してL-グルタミン酸を製造する方法につき研究した結果、従来のL-グルタミン酸生産菌を菌株として変異誘導したリゾチームに感受性を有する変異株を用いれば、過剰のビオチン含有培地を用いても、ビオチンによる抑制を受けることなく高い収率でL-グルタミン酸を生産できることを見出した。

紫外線照射、放射線照射、変異誘発剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された変異株からリゾチームに感受性を有する菌株を選択するには、菌株が生育可能な濃度のリゾチームを含有する培地で生育できなくて、リゾチーム無添加培地では菌株と同様に生育できるものを選ぶべき。従つて、ここでリゾチームに感受性であるとは、リゾチームに対する最小阻止濃度が菌株よりも低いことを意味する。また培地中に存在する^{通病の}ビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されないとは、培地中に存在する^{通病の}ビオチンによるL-グルタミン酸生産の抑制が実質的に無視できる程度のものであることを意味する。具体的には前記のごとき粗原料を用いた場合でも^{通病の}ビオチンによる影響を^{3字加入}無視できることを意味する。

本発明に用いる具体的に好適な菌株の一例としては、コリネバクテリウム・グルタミタムATCC/3032を菌株として得られたコリネバクテリウム・グルタミタムEY9703

(彼工研寄託受遺番号第44/1号、NRRL/1271)、コリネバクテリウム・グルタミタムEY9703(彼工研寄託受遺番号第44/2号、NRRL/1272)およびプレビバクテリウム・フラブムATCC/4067を菌株として得られたプレビバクテリウム・フラブムEY9733(彼工研寄託受遺番号第44/4号、NRRL/1273)があげられる。

コリネバクテリウム・グルタミタムATCC/3032を菌株としてリゾチーム感受性変異株^(株東興業社製)を取得する方法について以下具体的に説明する。^{3字加入}該菌株を粉末ブイヨン20g/lおよび酵母エキス5g/lの組成を有する培地(緩衝前pH7.2、以下C培地という)に接種し30℃で振盪培養する。中期対数期で培養を中止し、集菌し、生涯食塩水で洗浄後、4/30 トリス・マレート緩衝液(pH 6.0)に5×10⁶細胞/mlになるように懸濁する。この懸濁液に最終濃度300 mg/mlになるようにニトロソグアニジンを加え、25℃で30分間放置し、遠心分離に

より菌体を集め、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理食塩水に懸濁し、適宜生理食塩水で希釈してC培地にさらに2g/4の寒天を含む固体培地（以下CΛ培地という）に塗りつける。これを30℃で2日間培養し、生じたコロニー（約4000）を次の3種類の固体培地にレプリカ法により塗りつける。

- ① CΛ培地
- ② CLA培地：CΛ培地を加熱殺菌後、冷却して培地の温度が45℃まで下がってから200mg/lになるようにリゾチームを添加した培地。
- ③ MA培地：グルコース10g/l、 NH_4Cl 4g/l、尿素2g/l、 KH_2PO_4 1g/l、 K_2HPO_4 3g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400mg/l、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 49mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 44mg/l、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 409mg/l、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 404mg/l、

について菌株と比較した結果を第1表に示す。3種類の固体培地上での生育はレプリカ法で塗りつけ、30℃で2日間培養後判定した。表中生育欄の+は菌の生育が観察されたものを、-は生育が観察されなかったものを示す。また表中リゾチーム感受性は次のように試験した。すなわちC培地にて24時間30℃液体振盪培養した菌を集菌後、生理食塩水にて適当に希釈して菌体の懸濁液をつくる。この懸濁液10⁶細胞相当を倍々系列の濃度のリゾチームを含むCΛ培地に調下接種し、30℃で2日間培養する。菌の生育がまったく認められない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性値（最小生育阻止濃度）とした。

特開昭54-122794(3)
 ビオチン30mg/l、チアミン塩酸塩1mg/l、システイン塩酸塩20mg/lおよび寒天30g/lの組成を有する培地（殺菌前pH7.0）。

30℃で2日間培養後、CΛ培地で生育し、CLA培地で生育しない菌をリゾチーム感受性変異株として得る。MA培地で菌株と同様に生育する自己栄養性でリゾチームに対して感受性の変異株は試験した4000コロニーの中に1/10株得られた。この1/10株中17株がビオチン過剰培地でも多量のL-グルタミン酸を生産する能力を有していた。コリネバクテリウム・グルタミナムKY9703およびKY9703はかくして得られた変異株の一例である。プレバクテリウム・フラブムATCC13032を菌株とする変異誘導も上記と同様に行つて、プレバクテリウム・フラブムKY9733を得た。

上記例示の変異株のMA培地、CΛ培地、CLA培地での生育およびリゾチーム感受性値

第1表

菌 株	生 育			リゾチーム感受性値 最小生育阻止濃度 (MIC mg/ml)
	MA培地	CA培地	CLA培地	
コリネバクテリウム・ グルタミナム				
KY 9703	+	+	-	100
KY 9703	+	+	-	25
ATCC 13032	+	+	+	500
プレバクテリウム・ フラブム				
KY 9733	+	+	-	50
ATCC 13067	+	+	+	500

本発明の微生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機化合物、その他の栄養素を適当に含む培地ならば、通常L-グルタミン酸生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては蔗糖、ブドウ糖、糊糖などの糖質および、炭酸水素塩などが、窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、塩酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、

水酸化アンモニウム、クエン酸アンモニウム、
 酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素
 などの有機無機窒素化合物、ペプトン、肉エキ
 ス、コーンスチープリカーなどの天然栄養源な
 どが、無機化合物としては硝酸第一カリ、硝酸
 第二カリ、硫酸カリ、硫酸マグネシウム、塩化
 マグネシウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、硫酸
 マンガン、塩化マンガンなどが、その他の栄養
 源としてはビタミン、サイアミンなどが用いら
 れる。

培養は振盪培養、通気攪拌培養などの好氣的
 条件で行い、培養温度は $24 \sim 27^{\circ}\text{C}$ とくに
 $28 \sim 31^{\circ}\text{C}$ が好適である。培養中は適当な中
 和剤を用いてpHを $6 \sim 7$ に調整するのが好ま
 しい。培養は $1 \sim 3$ 日間行えば培養液中に微量
 のL-グルタミン酸が生成蓄積する。培養液か
 らのL-グルタミン酸の採取は、固体を除去し
 た上清液から、イオン交換樹脂による吸着法、
 浸出品析法、等電点品析法など、従来のL-グ
 ルタミン酸の製造において常用される諸方法を

適宜使用して行うことができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例1

グルコース 40g/l 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g/l 、
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l 、 KH_2PO_4 0.5g/l 、
 K_2HPO_4 1g/l 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3mg/l 、 $\text{MnSO}_4 \cdot$
 $4\text{H}_2\text{O}$ 3mg/l 、サイアミン塩酸塩 1mg/l 、フェ
 ノールレッド 10mg/l およびビタミン 3mg/l
 あるいは 100mg/l の組成を有する培地を調製
 し、pHを 7.0 に調整した後、 30ml ずつ 300
 ml 容の校正付フラスコに入れ、 115°C で 15
 分間加熱殺菌した。冷却後、別に加熱殺菌した
 尿素液を 2g/l になるように添加した。この
 培地に第2表に示した菌を接種し 30°C で振盪
 培養を行った。培養中培養液をpH $6.5 \sim 8.0$
 に保つため 12 時間目と 20 時間目の2回尿素
 液を 4g/l になるように添加し、 32 時間で培
 養を終了した。かくして培養液中に蓄積したL
 -グルタミン酸量は、第2表に示す通りである。
 培養液 1l から菌体を除去し、濃縮し、塩酸で

pH 3.2 に調整し、冷却してL-グルタミン酸
 の粗結晶を得た。粗結晶の量(g)を括弧内に
 示す。

第2表

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 mg/ml	
	ビタミン 2mg/l ビタミン 100mg/l	添加培地 添加培地
コリネバクテリウム・グルタミカム		
KY9703	21(47)	23(49)
KY9703	165(107)	140(104)
ATCC13032	20	0.2
プレビバクテリウム・フラブム	28(45)	28(45)
KY9733	28(45)	28(42)
ATCC4067	7.4	0.1

実施例2

実施例1で用いた培地中グルコースを甘露糖
 糖(グルコースとして 40g/l 相当量)に換
 え、加熱殺菌後の培地をpH 7.0 に再調整する
 以外は実施例1と同様に行つた。培養液中に蓄
 積したL-グルタミン酸量を第3表に示す。

第3表

菌 株	L-グルタミン酸蓄積量 (mg/ml)
コリネバクテリウム・グルタミカム	
KY9703	11.2
KY9703	11.6
ATCC13032	0.3
プレビバクテリウム・フラブム	
KY9733	2.7
ATCC4067	0.2

特許出願人(103)協和発酵工業株式会社

代表者 高 田 弘

手 続 補 正

昭和54年2月22日

特許庁長官 様

1. 事件の表示

昭和53年特許第28821号

2. 発明の名称

L-グルタミン酸の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出人
〒100
住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
名 称 (102) 協和薬業株式会社
代表者 木下 祝 郎

4. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄および特許請求の範囲の欄

5. 補正の内容

- 1) 明細書第6頁4行目の「および」を削除し次の記載を加入する。

「およびプレバクテリウム・サツカロリタイクム AT00 14066」を加入する。

- 5) 明細書第8頁18行目の「33」の後に「およびプレバクテリウム・サツカロリタイクム T321」を加入する。

- 6) 明細書第10頁第1表を次の通りに訂正する。

特開昭54-122794(5)

「コリネバクテリウム・グルタミクム T339 (微工研寄託受理番号第4799号、NRRL B-11433)、コリネバクテリウム・グルタミクム T527 (微工研寄託受理番号第4790号、NRRL B-11434)、コリネバクテリウム・リリウム ATCC 15990 から誘導されたコリネバクテリウム・リリウム T522 (微工研寄託受理番号第4791号、NRRL B-11435)。」

- 2) 明細書第6頁8行目の「NRRL 11275」の後に次の記載を加入する。

「およびプレバクテリウム・サツカロリタイクム ATCC 14066 から誘導されたプレバクテリウム・サツカロリタイクム T521 (微工研寄託受理番号第4792号、NRRL B-11436)。」

- 3) 明細書第8頁13行目の「および」を削除し、同14行目の「05」の後に「T339 および T327」を加入する。

- 4) 明細書第8頁16行目の「067」の後に

菌 株	生 育			リネア感受性 菌糸生育阻止 濃度 (MIC µg/ml)
	MA培地	OA培地	DLA培地	
コリネバクテリウム・グル タミクム				
T 539	+	+	±	400
T 527	+	+	—	200
KY 9705	+	+	—	100
KY 9705	+	+	—	25
AT00 13032	+	+	+	600
コリネバクテリウム・リ リウム				
T 522	+	+	—	50
AT00 15990	+	+	+	400
プレバクテリウム・フラ ブム				
KY 9783	+	+	—	50
AT00 14067	+	+	+	800
プレバクテリウム・サツ カロリタイクム				
T 521	+	+	—	100
AT00 14066	+	+	+	800

- 7) 明細 第14頁第5表の後に次の「実施例5」を加入する。

「実施例5」

使用菌株を第4表に示す菌株に替えて行う以外は実施例1と同様に行つて第4表に示す量のL-グルタミン酸の害後を見た。

第4表

菌 株	L-グルタミン酸害後量(μg/g)	
	ビオチン2μg/5添加培地	ビオチン100μg/5添加培地
コリネバクテリウム・グルタミカム		
T 339	25	110
T 327	105	130
ATCO 13032	20	0.2
コリネバクテリウム・リリウム		
T 322	20	100
ATCO 15990	83	0.1
プレビシテリウム・サブカロリテイクム		
T 321	105	110
ATCO 14066	25	0.2

- 8) 特許請求の範囲を別紙の通りに訂正する。

▲添付書類の目録

微生物保管委託申請書受理番号第 第1通

特許請求の範囲

- (1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してL-グルタミン酸を培地中に蓄積させ、これを採取する方法において、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない菌株を用いることを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。
- (2) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物。
- (3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・リリウム、プレビバクテリウム・フラブムまたはプレビバクテリウム・サブカロリテイクムに属する菌株から選ばれる特許請求の範囲2の微生物。
- (4) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミ

カムXY9705(微工研寄託受理番号第4412、NRRL 11271)、コリネバクテリウム・グルタミカムXY9705(微工研寄託受理番号第4413、NRRL 11272)、コリネバクテリウム・グルタミカムT339(微工研寄託受理番号第4789、NRRL B-11433)、コリネバクテリウム・グルタミカムT327(微工研寄託受理番号第4790、NRRL B-11434)、コリネバクテリウム・リリウムT322(微工研寄託受理番号第4791、NRRL B-11435)、プレビバクテリウム・フラブムXY9735(微工研寄託受理番号第4414、NRRL 11273)およびプレビバクテリウム・サブカロリテイクム^{T321}(微工研寄託受理番号第4792、NRRL B-11436)から選ばれる特許請求の範囲3の微生物。